

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-215534
(43)Date of publication of application : 22.09.1987

(51)Int.Cl. A61K 39/395
A23K 1/16
A23K 1/18
C07K 3/26
C07K 15/06

(21)Application number : 61-218859 (71)Applicant : FUOOBESUTO KK
(22)Date of filing : 17.09.1986 (72)Inventor : TOKORO HIDEO

(30)Priority
Priority number : 36026410 Priority date : 25.11.1985 Priority country : JP

(54) SPECIFIC ANTIBODY-CONTAINING MATERIAL FROM EGG, ITS PRODUCTION AND USE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a large amount of a specific antibody-containing material from the whole egg, egg yolk or the white produced from a hen which is inoculated with an antigen to form a specific antibody in the hen.

CONSTITUTION: A specific antibody-containing material which is obtained from the whole egg, egg yolk or the white of an egg produced by a hen previously inoculated with an antigen, containing an antibody specific to the antigen. A substance properly selected from pollen, bacterium, virus, mold, allergen, blood, sperm and toxin of diseased animal can be used depending upon the purpose of the formed material. When the material is used as an additive for food, the antigen is especially preferably an inactivated, attenuated or subunit antigen. Since the prepared formed product contains an antibody corresponding to the antigen used, it is ingested in an animal to show preventing and remedying effect on infection.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許出願公告番号

特公平7-53669

(24) (44)公告日 平成7年(1995)6月7日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/395	B			
A 2 3 K 1/16	3 0 4 Z	9123-2B		
1/18	D	9123-2B		
A 6 1 K 39/395	D			
// C 0 7 K 16/12		8318-4H		

発明の数2(全9頁)

(21)出願番号 特願昭61-218859

(22)出願日 昭和61年(1986)9月17日

(65)公開番号 特開昭62-215534

(43)公開日 昭和62年(1987)9月22日

(31)優先権主張番号 特願昭60-264108

(32)優先日 昭60(1985)11月25日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

審判番号 平4-7095

(71)出願人 99999999

株式会社ゲン・コーポレーション

岐阜県岐阜市折立296番地1

(72)発明者 所 秀雄

岐阜県岐阜市折立296番地の1 フォーベ
スト有限会社内

(74)代理人 弁理士 広瀬 章一

審判の合議体

審判長 磯部 公一

審判官 宮本 和子

審判官 赤坂 信一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 鶏卵からの特異的抗体含有材料およびその製造方法と用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】ブタの大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌の987P、K88およびK99抗原、およびウシの大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌のK99抗原のいずれか1種以上の抗原を鶏に免疫し、この免疫鶏が産生した卵の少なくとも卵黄を含む部分から抗体を回収することにより得られる、前記抗原に特異的なポリクローナル抗体を含有する、ブタまたはウシの哺乳期における大腸菌症の経口予防剤および治療剤。

【請求項2】飼料に添加して用いる請求項1記載の予防剤および治療剤。

【請求項3】鶏に、ブタの大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌の987P、K88およびK99抗原、およびウシの大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌のK99抗原のいずれか1種以上の抗原を接種し、該抗原に特異的な抗

体を鶏の体内に形成させること、

前記抗体が卵子内に形成されてから該鶏の産生した鶏卵を採取すること、

該鶏卵の前記抗体を含有する少なくとも卵黄を含む部分から前記抗体を回収すること、

からなる、前記抗原に特異的な抗体を含有する、ブタ、ウシの哺乳期における大腸菌症の予防剤および治療剤の製造方法。

【発明の詳細な説明】

(産業上の利用分野)

本発明は、鶏卵を利用して、動物の哺乳期下痢の原因となる腸管毒素原性大腸菌の抗原に特異的な抗体を含有する予防剤および治療剤を製造する方法、およびその抗体を含有する予防剤および治療剤に関する。

(従来の技術)

従来、ブタ、ウシ等の新生獣の哺乳期下痢は、その罹患率および死亡率の高さから大きな問題であった。ブタやウシの哺乳期下痢に関与する病原体には種々の細菌およびウイルスがあるが、そのうちでも腸管毒素原性大腸菌を原因菌とする大腸菌症は、新生獣が感染した場合、非常に経済的被害の大きい腸管感染症である。これらの対策にはワクチンおよび抗生物質の投与があるが、ワクチンは妊娠豚あるいは妊娠牛に予め接種することが必要であり、発病した新生獣に対する治療としては行えない。しかも、ワクチンによる効果は、母豚あるいは母牛の血中抗体価を高め、血清から初乳に移行した抗体を幼獣が摂取することより感染を防御するものであるが、初乳中の抗体は分娩3日後には顕著に減少するため効果の持続期間は非常に短い。従って、生後1周齢から離乳期までの哺乳期下痢は予防できないという欠点がある。

そこで、抗生物質の投与が行われているが、この使用は食肉中の残留につながり、食品の安全性の点から問題である。また、耐性菌の出現により使用薬剤の変更、新たな薬剤の開発が必要となり、耐性菌自体の害も危惧される等、その大量使用について見直されてきている。

また、抗体含有成分の製造については、米国特許第4,402,938号には、分娩前の牛その他の有蹄類動物の乳房に抗原物質を接種し、分娩後に初乳およびその後の乳を採取し、これから脂肪分と固形分を除去して乳清を得、この乳清を0.2μm以下の孔径のフィルターで限外過することにより、口液として分子量1200以下の未知構造のフードファクターを含んだ生成物が得られることが開示されている。この方法によれば、抗原物質としては、花粉、細菌、ウイルス、カビ、アルレゲン、精子および毒素が使用できる。有効成分として上記のフードファクターを含有する生成物は、栄養補給剤として有用である。しかし、上記方法では分娩最終週の牛に抗原を投与しなければならず、また採取対象も初乳を必須成分として含むが、これは分泌期間が分娩後数日間と極めて限られているため、大量に生産しようとすると非常に大規模な農場を確保することが必要となり、我が国において上記方法を継続して適用することは一般に困難である。

上述の米国特許においては、乳清からの有効成分の分離を0.2μmのフィルターで行っているため、生成物としてのフードファクターの他に、B溶解素、コングルチニン、インターフェロン、ラクトフェリン、ラクトペルオキシターゼ、Bリンパ球、リゾチーム、マクロファージ、ポリペプチド、プロペリドン、チオシアネートなどを含有するとされているが、これより分子量の大きい、抗体分子などの乳中の有用成分が生成物から完全に除かれてしまっている。したがって、製造過程において牛に抗原物質を投与しているにもかかわらず、その抗原に特異的な抗体の一部が生成物に含まれずに利用されないままになっている。

さらに、上記米国特許の方法は、初乳とその後の乳を別

々に処理し、固形分の分離のために数十日の連結を必要とするなど操作も煩雑である。

このように、抗体含有材料を製造するのに、従来の製造法では大量に安価に製造することは難しかった。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明は、ワクチンや抗生物質の使用に伴う欠点をもたず、ブタおよびウシの哺乳期下痢に対して効果的で安全な予防剤および治療剤を開発することを目的とする。また、本発明の目的は、上記予防剤および治療剤に用いる抗体含有材料を大量に供給できる安価な方法を提供することである。

(問題点を解決するための手段)

本発明者は、かかる目的を達成すべく、哺乳期下痢に有効で安全な薬剤を、大量にかつ安価に提供しようと鋭意検討を重ねた。しかし、抗体含有材料の製造に牛を使用すると上述した制約を避けることができないため、鶏の利用に着目して実験を重ねたところ、鶏の利用によって効率的にしかも時期を選ばずに接種した抗原に対応する抗体が生産され、この抗体を含む各種用途に有用な材料を得ることができることを知り、本発明を完成した。

ここに、本発明の要旨とするところは、ブタの大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌の987P、K88およびK99抗原、およびウシの大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌のK99抗原のいずれか1種以上の抗原を鶏に免疫し、この免疫鶏が産生した卵の少なくとも卵黄を含む部分から抗体を回収することにより得られる、前記抗原に特異的な抗体を含有する、ブタまたはウシの哺乳期における大腸菌症の予防剤および治療剤である。

この予防剤および治療剤は経口的に投与され、飼料に添加して用いることもできる。

本発明は、また、鶏に、ブタの大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌の987P、K88およびK99抗原、およびウシの大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌のK99抗原のいずれか1種以上の抗原を接種し、該抗原に特異的な抗体を鶏の体内に形成させること；前記抗体が卵子内に形成されてから該鶏が産生した鶏卵を採取すること；および該鶏卵の前記抗体を含有する少なくとも卵黄を含む部分から前記抗体を回収することからなる、前記抗原に特異的な抗体を含有する、哺乳動物の哺乳期における大腸菌症の予防剤および治療剤の製造方法である。

なお、前記抗体含有材料の利用形態としては、前記卵の全卵もしくは卵黄をそのまま回収して利用する場合と、前記卵の全卵、卵黄もしくは卵白から分子量10,000以下のものを分離回収して利用する場合がある。前者の場合には抗体を含有するため腸管感染症の予防治療用として有用であり、後者の場合、分子量10,000以下の区分にはTF(トランスマッパー)等が含有されているため、感染症の治療用として使用するのが特に好ましい。残りの分子量10,000超の区分には抗体の実質的部分が含有されるため、特異的抗体含有材料としてそのまま別途

利用できる。

本発明の抗体含有材料はまた、前記特異的抗体のほかに、米国特許第4,402,938号に記載のフードファクターも含有していると考えられ、したがって、この米国特許に記載の栄養補給および感染予防効果も本発明の抗体含有材料により得られよう。

なお、本発明にあって、特異的抗体は分子量10,000で区分すると前述の分子量10,000以下の区分には実質的含有されないが、便宜上この区分も抗体含有材料と称する。後述するところから明らかのように、この分子量10,000以下の区分は上記フードファクターに相当するものである。

本発明抗体含有材料は、動物の大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic E. coli、以下ETECと略称する) からなる抗原、特に線毛抗原である987P、K88、K99に特異的な抗体を含有する抗体含有材料であり、ブタ、ウシ等の哺乳動物の哺乳期における大腸菌症の予防剤および治療剤として優れた効果を発揮する。ブタ、ウシ等の哺乳動物の哺乳期における腸管感染症は前述のように、死亡率が高く経済的に大きな問題であった。例えば新生豚の腸管感染症には大腸菌症、伝染性胃腸炎、ロタウィルス感染症等があり、これらが単独あるいは複合して哺乳期の動物に、下痢や脱水等の重篤な症状を引き起こし死亡に至る率が高く、また回復したとしても発育が著しく遅延し生産性の低下をもたらす。腸管感染症の中でもETECに起因する大腸菌症が占める割合は大きく、またロタウィルスとの混合感染は特に症状を悪化させることが知られていた。大腸菌症の下痢は進行につれ水様となり、水様性下痢が数時間続くと脱水状態になり、全身は削痩せ、萎縮し、敗血症に陥り死亡することが多く、多大な経済的損失を与える。

従来、ETECによる大腸菌症の予防法としてはETECのワクチンを母豚に注射して血中の抗体価を高め、血清から初乳に移行した抗体を哺乳豚が摂取することにより発症を防御する方法があった。しかし、この方法ではワクチンの効力は生後1週齢までと短く、それ以降の哺乳期下痢には対応できなかった。そこで、予防の目的で抗生物質が使用されているが、抗生物質の長期間にわたる使用は、周知のように、耐性菌の出現により使用薬剤の変更や新たな薬剤の開発を必要とし、また耐性菌の人体に対する影響も危惧される。加えて、食肉として使用する動物の場合は、抗生物質の食肉中へ残留の問題があった。本発明の抗体含有材料では、時期を選ばず必要時に簡便に投与して、ブタ、ウシ等の哺乳動物の哺乳期の大腸菌症を効果的に予防および治療することができる。また副作用も認められず、抗生物質の使用に伴う上記のような問題も生じない。

さらに、本発明の抗体含有材料は経口投与により大腸菌症の予防および治療が可能なので、異種抗体の注射による受動免疫の際に生じるアナフィラキシーショックや血

清病等の心配もない。

本発明において使用する抗原は大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌の線毛抗原である。全菌体あるいはこれを不活化したものおよび弱毒化したものを使用することもできるが、線毛抗原を使用すると、免疫する鶏に対して内毒素による副作用を生じずに産卵率を上げて免疫卵を効率よく回収できる利点がある。本発明で使用する具体的な線毛抗原はブタETECの987P、K88、K99抗原、ウシETECのK99抗原である。

(作用)

本発明の抗体含有材料の製造方法の例を具体的に次に説明する。ただし、本発明の精神から離れることなく、この方法の各種の変更法あるいは別法も考えられるが、それらはいずれも本発明の範囲内である。

まず、ブタETEC 987P、K88、K99抗原などの適宜の抗原を、所望により免疫増強剤（アジュバント）と共に鶏に接種する。この接種は皮下注射あるいは腹腔内投与などの適宜の経路で可能である。抗原の接種量は、使用抗原の種類及び免疫增幅剤の種類に応じて所望の抗体が体内に適当量形成され、過度の毒性が発揮されないよう選択する。これらの選択は実験により適宜行うことができる。通常は、抗原の投与から数週間以内に該鶏の体内に投与した抗原に特異的な抗体が形成され、その鶏が産生する卵にこの抗体が含まれるようになる。高力価の抗体が持続するように適当な間隔（通常、最低2～4週間）で同じ抗原を追加接種することもできる。卵における抗体の含有は、既知の検査法により確認することができる。

このようにして抗体が卵に含有されるようになった後、その鶏が産生する卵を採取する。同種の抗体を含有する卵が適当量集まつたところで、抗体含有成分を回収する。

まず、全卵あるいは卵黄を取り出し、攪拌することによって、エマルジョン状とする。場合によっては、水を加えて希釈する。次に、分子量10,000カットの限外ロ過フィルターを使用することによって、抗体成分とフードファクターを得ることもできる。

すなわち、抗体成分を得るためにには抗体を含有する卵エマルジョンそれ自体または分子量10,000超の抗体成分のみを原料としてその抗体活性が破壊されないような方法、たとえば、スプレードライ法または連結乾燥法により抗体を安定的に回収することができる。

一方、分子量10,000以下のフードファクターは次のようにして分離、回収することができる。たとえば1N塩酸を適当な酸性度（例:pH4.5程度）になるまで添加し、固形分を沈殿させる。沈殿物を高速遠心によって除去した後、アルカリ、たとえば1N NaOH水溶液で中和する。この酸化と中和も適当な攪拌下で実施する。このような酸処理に代えて、有機溶媒で処理することもできる。次に、得られた上清を、分子量10,000カットの孔径をもつ

た限外口過フィルター（孔径=0.45μm）により限外口過して、フードファクターを含有する画分を捕集することができる。この限外口過フィルターの孔径を選択することによって、ウイルス、マイコプラズマ、細菌などを有効に除去できる。すなわち、分子量およそ10,000超の抗体分子量は除去されるので、ウイルスや細菌は除かれ、フードファクターが主成分として口液に残留する。以上の操作は、通常は室温よりあまり高くなない温度以下、たとえば0~25°C程度の温度で行うのが好ましい。得られた生成物は、液状のままあるいは凍結乾燥などの適宜の手段により保存することができる。

かくして、本発明によれば、鶏を抗原接種対象動物にすることから、多数の個体に接種が可能であって、また常に卵を生産しているから時期的にも何ら制限されず、簡便に生物体内の抗体産生反応を利用できるのである。また、多数の個体を利用できるので、多様な多くの抗原に容易に適用でき、さまざまな種類の異なる抗体含有材料を計画的に同時に製造することができる。

しかも、本発明では、鶏卵を回収するだけでよいから、簡便であり、またその後の処理も著しく簡便かつ容易になる。

こうして得た抗体含有材料（抗体成分および／またはフードファクター）は、各種の用途に有用であると期待され、たとえば、飼料用添加物、医薬品、化粧品、食品として利用できよう。

次に、本発明をその実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はそれらによって特に制限されるものではない。

実施例1

この実施例は、免疫された鶏の卵から特異的抗体含有卵粉末を調製する方法を説明する。

（免疫）

実験用鶏に、抗原としてブタETEC（腸管毒素原性大腸菌）の987P抗原を、1羽につき約45mg皮下注射した（初回免疫）。4週後に同量の同じ抗原をブスターとして再度注射した。この鶏が産生した鶏卵について、凝集反応を用いた既知の測定法により抗体定量試験を行った。初回免疫以降の卵黄中の抗体価の変化を第1図に示す。このグラフより、卵黄中の抗体価は初回免疫後8週間で飽和値に達したことが分かる。

同様の方法により、別の実験用鶏にブタETECのK88およびK99抗原をそれぞれ免疫した。同じく凝集反応を用いた既知の抗体測定法により、それぞれの抗原に対する特異的抗体の生成を確認した。

（鶏卵抗体の調製）

鶏卵中の抗体価が最大値に達したところで、特異的抗体を調製するために鶏卵の採取を開始した。採取した鶏卵から卵黄のみを用い、これをスプレイドライ法によって粉末化し、抗体含有粉末とした。

こうして得た抗体含有粉末を37°Cで保存した場合の安定

生を次のようにして評価した。この抗体粉末1gをmlのPB Sに溶解し、等量のクロロホルムを加えて強く振盪した後、3,000rpmで20分遠心分離処理をして、抗体含有画分として上清を得た。この上清の力価を凝集反応により測定した。結果を表1に示す。

表1から明らかなように、いずれの抗原を用いて得られた抗体含有粉末の場合も、6か月保存後の抗体力価はほとんど変化せず、安定性は良好である。

この抗体含有粉末は、そのままあるいはクロロホルム処理等の方法によって卵黄脂質成分を除去して、飼料添加物や医薬品として経口的に使用することができる。

第1表 保存後の抗体力価

ロット番号	抗原 (定着因子)	37°Cでの保存月数				
		0	1	2	3	6
1	K88	128	128	128	128	128
	K99	128	128	128	128	128
	987P	256	256	256	256	256
2	K88	256	256	256	256	256
	K99	256	256	256	256	256
	987P	512	512	512	512	512
3	K88	512	512	512	512	512
	K99	512	512	512	512	512
	987P	512	512	512	512	512

以下の実験例1および2において、本発明抗体含有材料の予防効果および治療効果を示す。使用した抗体含有材料は、ブタETECの987P抗原を産卵鶏に免疫して得た抗体含有卵の卵黄をスプレイドライ法により乾燥粉末剤としたものである。

実験例1（予防実験）

初乳を摂取後の生後19時間の実験豚を、抗体投与群と対照群とに分け、抗体投与群には凝集抗体価1,000倍の上記鶏卵抗体粉末を経口的に投与した。この投与は1日3回行い、実験終了まで続けた。

対照群および抗体投与群に対して、生後20時間目に2×10¹⁰個の987P-ETECで攻撃した。攻撃後の体温の変化、臨床症状および攻撃菌の増殖状況をそれぞれ評価した。結果は第2図および第2表ないし第4表にまとめて示す。

第2図から、抗体投与群では、攻撃直後一旦体温が低下するが、ほぼ2日経過後直ぐに回復し、一方、対照群では体温の回復が数日遅れることが分かる。この時の臨床症状は第2表に便の状態によってまとめて示すように、抗体投与群では3日目では全く正常便となるが、対照群では死亡例も含めて5日経過後も回復していない。同様の傾向は第3表および第4表からも看取される。

第 2 表
987P⁺ETEC 攻撃後の臨床症状

攻撃後日数	抗体投与群			対照群						
	1(♂)	2(♀)	3(♀)	4(♂)	5(♂)	6(♂)	7(♀)	8(♂)	9(♀)	10(♂)
0(日)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
2	1	1	1	3	3	3	4	3	3	3
3	0	0	0	3	4	3	•	2	3	3
4	0	0	0	3	•	3	•	2	3	3
5	0	0	0	2	•	2	•	2	2	2

症状の程度 0=正常便、1=軟便(形をとどめる)、2=軟便(形をとどめない)、3=水様便、4=死亡

第 3 表
仔豚糞便からの攻撃菌の分離

攻撃後日数	抗体投与群			対照群						
	1(♂)	2(♀)	3(♀)	4(♂)	5(♂)	6(♂)	7(♀)	8(♂)	9(♀)	10(♂)
0(日)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	#	#	#	+	#	#	#
2	—	—	—	#	#	#	•	#	#	#
3	—	—	—	#	#	+	•	+	#	#
4	—	—	—	#	•	+	•	+	#	#

DHL寒天培地における攻撃菌コロニーの割合

+=約50%、#+=約80%、##=約100%

第 4 表
仔豚小腸内容からの攻撃菌の分離

小腸部位	抗体投与群			対照群						
	1(♂)	2(♀)	3(♀)	4(♂)	5(♂)*	6(♂)	7(♀)*	8(♂)	9(♀)	10(♂)
十二指腸	—	—	—	—	—	#	+	#	#	#
空腸	—	—	—	—	—	—	#	#	#	#
回腸	—	—	—	#	#	#	#	#	#	#

DHL寒天培地における攻撃菌コロニーの割合

+=約50%、#+=約80%、##=約100%

* №5と7は死亡時に、他は攻撃後5日目に材料採取。

実験例 2 (治療実験)

生後約20時間目の仔豚8頭に、 2×10^{10} CFUの987P⁺ETECを経口接種し、その約6時間後に水様便となった段階で、4頭づつ2群に分け、抗体投与群には前記抗体含有粉末の凝集抗体価を4,000倍になるように調整した滅菌人工乳5mlを1頭当たり1日に3回、試験が終了するまで経口的に投与した。一方、残りの4頭は抗体を投与しない対照群とした。

接種後4日目に生存している豚を試験のために屠殺した。観察は①下痢の程度、②死亡率、③直腸便および小腸各部位からの接種菌の分離、④増体重について行った。

結果は第5表および第6表、第3図ないし第5図にまとめて示す。

第3図は、抗体含有粉末の投与が接種後の臨床症状に及ぼす影響を示す。各群とも接種1日目には水様便を呈していたが、投与群では2日後に軟便となり、3日後には正常便となった。これに対し、対照群では水様便が屠殺時まで続いた。

第5表は接種後の死亡率に及ぼす影響を示している。投与群では全頭生存したのに対し、対照群では接種後1日に2頭が死亡した。

第4図は糞便からの接種菌の分離率に及ぼす影響を示している。接種後1日目には全頭の豚から接種菌が分離された。投与群では4日後には全く分離されなくなったのに対し、対照群では屠殺時まで全頭から菌が分離された。

第6表は小腸の各部位における接種菌の分離率を示して

いる。投与群では全頭においていずれの小腸部位からも接種菌は分離されなかったのに対し、対照群では全頭の回腸、2頭の十二指腸および3頭の空腸より菌が分離された。

第5図は接種後の増体重に及ぼす影響を示している。投与群では2日後に体重増加が認められ、3日後には最初の体重となった。対照群では接種後体重が大きく減少し、3日後に体重増加が認められたものの、4日後の体重は最初よりもずっと低かった。

以上の実験例1および2からも明らかなように、本発明の抗体含有材料は大腸菌症の予防および治療に有効である。

第5表
死 亡 率

頭数	抗体価	接種後日数			
		0	1	2	3
投与群	4	1:4,000	0	0	0
対照群	4	≤10	0	2	0
				0(0/4)*	0(2/4)

* 死亡頭数／総頭数

第6表
小腸各部位からの接種菌の分離率

頭数	抗体価	分離率(%)		
		十二指腸部	空腸部	回腸部
投与群	4	1:4,000	0	0
対照群	4	≤10	50	75

実施例2

ウシETECのK99抗原およびブタETECのK99抗原を産卵鶏に免疫して、特異的低抗体が生成されることを確認した。ウシ由来株としては、下痢便から分離したB44株（09:K30:K99:F41:ST⁺）を使用し、ブタ由来株としては同様に分離した431株（0101:K30:K99:ST⁺）を使用した。これらの菌より各K99抗原を分離し、K99抗原量が1ml中1mgとなるように調整したK99抽出液を得た。

K99抗原液に等量のオイルアジュバンドを加えて混和し、免疫原を準備した。約18~20週齢の産卵鶏20羽を2群に分け、半数の鶏にウシ由来K99抗原を、残りの鶏にはブタ由来K99抗原を免疫した。免疫方法は、各抗原を産卵鶏の胸部筋肉内に1mlずつ注射し、さらに初回免疫後6週目に同量の抗原を1mlずつ再接種した。

免疫鶏の産生した卵の卵黄に、同量の生理食塩水を加えて溶解し、次いで、卵黄脂質成分を除去するためその溶解物に対して等量のクロロホルムを加えて振盪し、遠心によって抗体含有分画である水溶性分画を得た。

この水溶性分画をH.Yokoyamaら（Infect & Immun 60:998~1007, 1992）の方法により抗体価測定を行った。

ブタ由来K99抗原およびウシ由来K99抗原を免疫したときの卵黄内移行抗体価の推移を第6図に示す。また、得られた抗体の各抗原に対する反応性を第7表に示す。

ブタ由来K99抗原とウシ由来K99抗原との間に免疫原としての抗原性の差異はないことが従来より知られていたが、上記結果からもそれが裏付けられる。

第7表
ブタ由来およびウシ由来
K99抗原の卵黄内移行抗
体に対する反応性

由来	抗原	卵黄移行抗体	
		ウシK99	ブタK99
ウシ	K99	2,048 ¹⁾	2,048
	K88	<2	<2
	987P	<2	<2

1)は卵黄内移行抗体価を示す。

次に、対象動物として新生子を用いた場合の抗K99抗体の発症防御効果を示す。

実験例3

初乳を1回投与した新生牛を搬入し、生後22時間目に抗体を投与し、その後2時間後に 1.6×10^{11} CFUのK99+ETEC B44株を経口投与した。新生牛は抗体投与群と対照群ともそれぞれ4頭用い、抗体投与群では凝集抗体価2,000倍の抗体粉末を1日3回、1.5ℓの市販牛乳に溶解して給与し、対照群には市販牛乳のみを供与した。なお、投与する抗体は実施例2の方法によりウシETEC K99抗原で免疫した鶏の卵の卵黄より得た乾燥粉末製剤を用いた。毎日、臨床観察、体温測定および糞便の菌数測定を行った。また脂肪牛および観察終了時に体重を測定し、その後全頭解剖し、小腸内容物を血液寒天培地で培養して得られた分離株を、毒素原性大腸菌線毛抗血清K99（デンカ生研）とのスライド凝集反応によりK99抗原の有無を検査した。

結果を第8表および第9表に示す。同表より明らかなように、抗体投与群では一過性の下痢が観察されたが、全例生存した。これに対し、対照群では攻撃後激しき下痢、脱水が続いた後死亡した。また、死亡牛の小腸内容物1gから 10^8 ~ 10^{10} CFUの攻撃菌が検出されたが、抗体投与群の検出菌数は有無に低かった。このように、抗K99抗体の経口投与により、K99+ETECによる死亡が防御された。

第8表

供試牛	投与抗 体価	生死	下痢発生まで の時間(hr)	下痢の持続 期間(日)
1	—	死亡	18	1
2	—	死亡	21	3
3	—	死亡	16	1
4	—	死亡	12	2

供試牛	投与抗 体価	生死	下痢発生まで の時間(hr)	下痢の持続 期間(日)
5	2,000	生存	16	1
6	2,000	生存	18	1
7	2,000	生存	20	1
8	2,000	生存	18	2

第 9 表

供試牛	体重(kg)		糞便にお けるETEC の分離期 間(日)	小腸におけ るETEC菌数 (CFU/g)
	攻撃 前	攻撃終 了時		
1	39.5	34.7	1	2.0×10^8
2	40.8	36.3	3	4.6×10^{10}
3	46.1	43.1	1	1.2×10^9
4	36.2	31.2	2	7.6×10^8
5	37.3	38.6	7	1.5×10^7
6	30.9	33.4	4	$<10^4$
7	38.9	41.3	7	1.0×10^6
8	35.2	36.7	6	$<10^4$

(発明の効果)

すでに述べたところから明らかなように、本発明によれば、鶏を抗原接種対象動物にしてその產生する卵を採取

するため、多量にかつ安価に抗体含有材料が製造でき、あるいは、場合によっては抗原を多種用意して各鶏にそれぞれ接種することにより多くの種類の抗体含有材料を少量だけ簡便かつ安価に製造できる。

また、現在大きな問題になっている腸管毒素原性大腸菌による大腸菌症である哺乳期下痢症に対しても、本発明にかかる特異的抗体含有材料の投与によりほぼ完全に予防または治療できることから、その実際上の利益には計り知れないものがある。

【図面の簡単な説明】

第1図は、免疫後日数と卵黄抗体価との関係を示すグラフ、

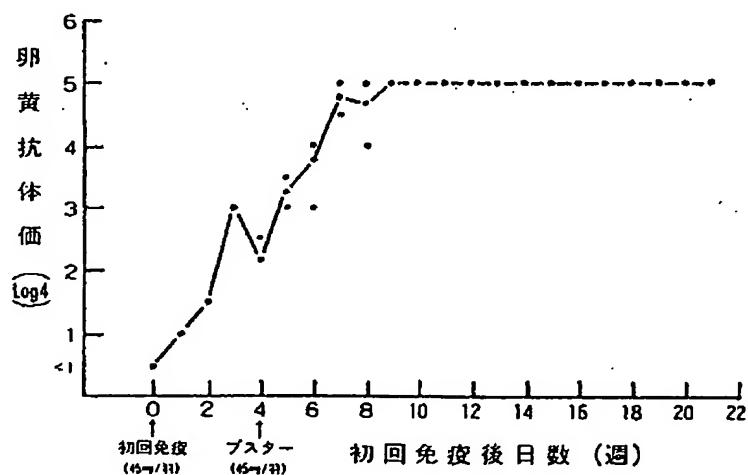
第2図は、攻撃菌投与後の仔豚の体温の変化を示すグラフ、

第3図は、接種菌投与後の臨床症状の変化を示すグラフ、

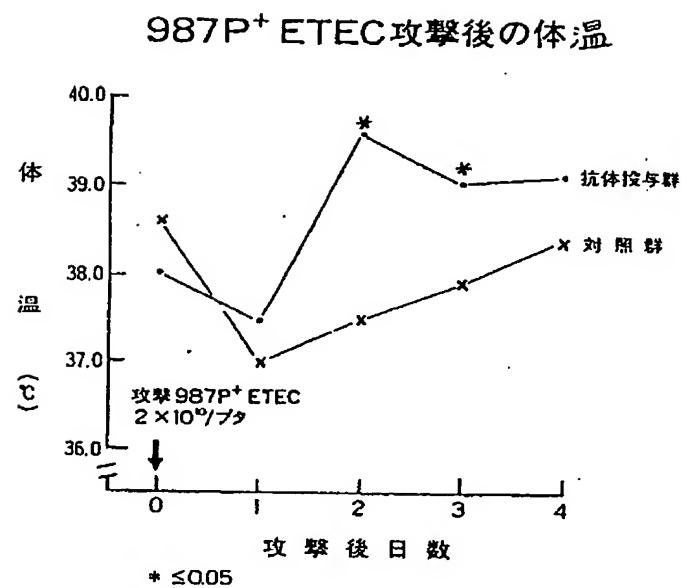
第4図は、接種菌投与後の糞便からの接種菌の分離率の変化を示すグラフ、および

第5図は、接種菌投与後の増体重の変化を示すグラフ、第6図は、産卵鶏にブタおよびウシ由来のK99抗原を免疫したときの卵黄内移行抗体価の推移を示すグラフである。

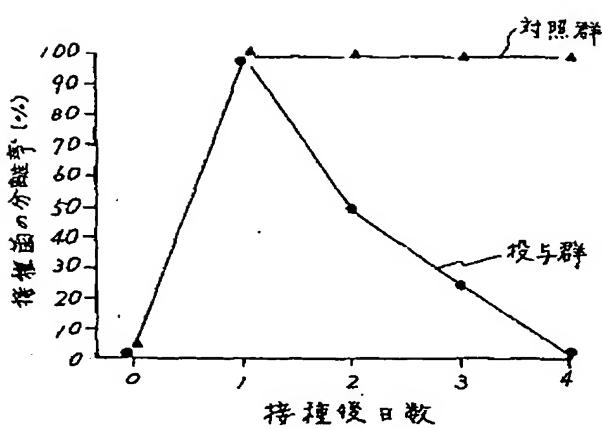
【第1図】

採卵鶏にブタETEC 987P抗原を免疫した
時の卵黄抗体価の推移

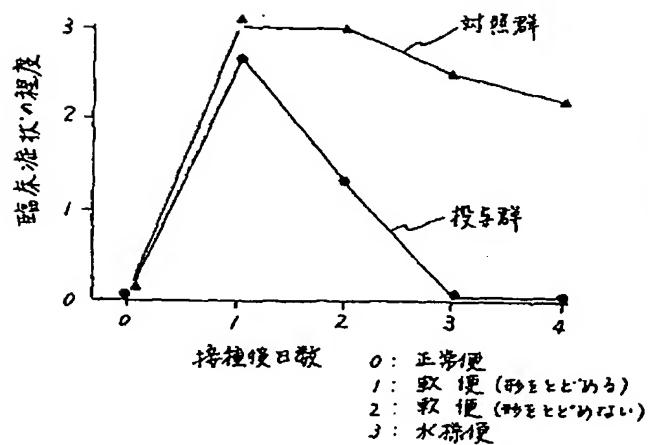
【第2図】



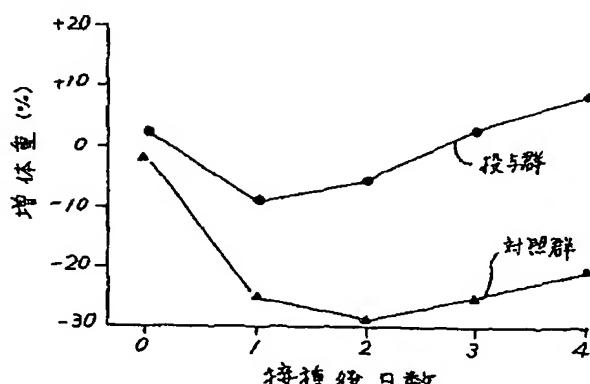
【第4図】



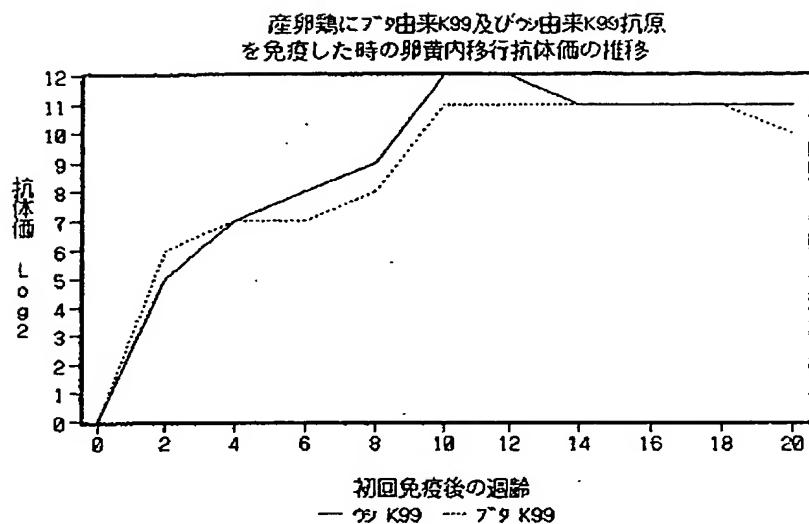
【第3図】



【第5図】



【第6図】



フロントページの続き

- (56)参考文献 J. Infectious Diseases Vol. 142, No 3, P. 439~441
 Research in Veterinary Science (1975), 18, P. 117~120
 INFECTION AND IMMUNITY, Nov. 1983, P. 653~658